Aus dem Hygienischen Institut der Universität Tübingen
Vorstand: Prof. Dr. K. Wolf

Ueber den Einfluß der ultravioletten Strahlen auf die Vitalfärbbarkeit der Hefezellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahn-Heilkunde
einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Willy Rupp aus Roth bei Nürnberg

Buchdruckerei Karl Müller vorm. Fr. Feuerlein
Roth bei Nürnberg 1932

Dekan:

Professor Dr. Haffner

Berichterstatter:

Privatdozent Dr. Saleck

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Zum Druck genehmigt von der
Medizinischen Fakultät Tübingen

Die ersten Versuche über die bakterizide Wirkung des Lichts wurden in den Jahren 1877 und 1878 von Downs und Blunt mit dem Sonnenlicht angestellt. Seitdem sind zahlreiche Untersuchungen über die keimtötende Wirkung des Lichts veröffentlicht worden, ohne daß bis heute der ganze Fragenkomplex erschöpfend beantwortet ist. Die wichtigsten davon sollen im Anschluß an Reichel (1) und Graßberger (2) kurz erwähnt werden. Französische Forscher wie Arloing, Duclaux und Roux studierten in der Mitte der 80er Jahre des vorigen Jahrhunderts die Wirkung des Lichts gegenüber den Milzbrandsporen. Geisler untersuchte 1891/92 die Wirksamkeit der Bestandteile des Sonnen- und des Bogenlichts; er fand ultrarote Strahlen als wirksam, rote nicht, die anderen umso wirksamer, je kürzer sie waren, die ultravioletten aber, die er als erster unter Heranziehung von Uranglas prüfte, als die allerwirksamsten. Buchner (3) führte 1892 neue Methoden ein, indem er einerseits wässrige Bakteriensuspensionen zuerst belichtete und dann mit Nährstoffen versetzte, und andererseits die in Agarplatten erstarrte Keimsuspension exponierte, wobei ein Teil der Platten durch Schriftzeichen aus schwarzem Papier beschattet war; nur an den beschatteten Stellen wuchsen die Keime aus. Buchner untersuchte noch die Frage des natürlichen Keimgehalts der Gewässer unter dem Einfluß des Tages- und Sonnenlichts. Es folgten die Arbeiten von Dieudonné, Kruse und anderen, die zur Verfeinerung der Fragestellung und Verbesserung der Methodik wesentlich beitrugen. Die Verwendung des Lichts in der Therapie lokaler und allgemeiner Infektionskrankheiten führte weiterhin zu einer lebhaften Diskussion über die bakteriziden Wirkungen des Lichts; besonders durch die Finsentherapie kamen wertvolle Arbeiten zustande. Die umfangreiche Monographie „Lichtbiologie" von Guni Busck (1904) bildete eine gute Zusammenfassung des von der Finsenschule damals erreichten Stands des Wissens und leider infolge des bald darauf erfolgten Todes Finsen's auch einen gewissen Abschluß. Es folgten aber nun

unmittelbar darauf in Deutschland, angeregt durch die Erfolge der Finsenschule, die drei bedeutsamsten lichtmikrobiologischen Arbeiten, deren Ergebnisse zum Teil noch wesentlich weiter führten, und zwar von Hertel, von Thiele und Wolf und von Wiesner.

Hertel stellte sich die bis dahin immer noch ungelöste Aufgabe, die biologischen Wirkungen und zwar sowohl Reiz- als auch Schädigungswirkungen monochromatischer Strahlen von abgestufter bolometrisch gemessener Intensität und möglichst eng begrenzter Wellenlänge vergleichend festzustellen.
Wiesner unternahm es, die Fragen der Sonnenlichtwirkung auf pathogene Keime mit besserer Methodik erneut zu prüfen.

Thiele und Wolf (4) setzten sich zum Ziel, die Rolle der Wellenlänge, des Sauerstoffs und der Temperatur bei der Lichtbacterizidie noch einmal unter exakteren Bedingungen, als bisher geschehen, zu prüfen. Die Exposition der Testkeime geschah in dünner Suspension, welche in einem Quarzröhrchen durch einen Gasstrom — O_2 oder reinsten H_2 — in ständiger Bewegung gehalten wurde, in bestimmten Abständen (20 cm bzw. 4,5 cm) von einer konstant gehaltenen Kohlen- bzw. Quecksilber-Bogenlampe in einem quarzgefensterten, durch eine Schlange heiz- und kühlbaren Wasserbad, in dem sich die Filterflüssigkeit befand. Die überlebende Keimzahl wurde durch Plattenkultur festgestellt. Das jeweils zur Wirkung gelangende Spektrum wurde photographisch aufgenommen und wiedergegeben. Es ergab sich zunächst bei 16° C und unverdünnter Bouillon keine, auch nur durch Plattenkultur feststellbare Wirkung. Erst in 1000 fach verdünnter Bouillon, wo das volle Ultraviolettspektrum erschien, gelang, je nach der Lampe, in 15 oder 7,5 Minuten die Abtötung. Das sichtbare Licht war also bei dieser Anordnung unwirksam. Ein Glasfilter oder Absorption des Ultraviolettlichts durch 10%iges KNO_3 oder $C_2O_4H_2$ hob die Wirkung auf. CSK-Lösung jedoch, die 265—300 $\mu\mu$ durchläßt, nicht. Umgekehrt hatte das ultraviolette Licht, durch dunkelblaues Steinsalz fast allein durchtretend, noch deutliche Wirkung. Diese Wirkungen erwiesen sich als unabhängig von der O_2-Gegenwart, H_2O_2 wurde dabei nicht, HNO_2 nur bei Gegenwart von N-Verbindungen gebildet. Bei höheren Temperaturen bis zu 40° C ergab das Gesamtlicht etwas raschere Abtötung und auch beim Glasfilterlicht trat bei 31° C eine solche in geringem Maße

auf, indem die Keimzahl in 2 Stunden auf $^1/_{10}$ zurückging. Diese Wirkung des sichtbaren Lichts, welche auch ohne H_2O_2- oder HNO_2-Bildung verlief, blieb aber bei O_2-Ausschluß durch den H_2-Strom aus.

Seit diesen großen, gewissermaßen klassischen Arbeiten brachte die mikrobiologische Lichtliteratur zwar noch eine bedeutende Zahl von Veröffentlichungen und zum Teil auch von sehr wertvollen Feststellungen, deren Bedeutung aber jene keineswegs überragte. Außerdem wurde die Frage der praktischen Verwendbarkeit des ultravioletten Lichts für die Trinkwassersterilisation, die in Anbetracht der Durchlässigkeit des Mediums noch am meisten Aussicht auf Erfolg bieten konnte, lebhaft erörtert. Erwähnt sei nur noch die von Lotte Oehlschlägel (5) im hiesigen Hygienischen Institut ausgeführte Arbeit, die die Sporenresistenz gegen Ultraviolettlicht unter genauer Einhaltung der Methodik von Thiele und Wolf untersuchte. Auch die höchstdampfresistenten Sporen starben im ultravioletten Licht binnen 3 Minuten völlig ab, ein Unterschied in der Empfindlichkeit der Arten wurde nicht festgestellt.

Es wurde nun immer wieder die Frage aufgeworfen, wie die Abtötung der Bakterienzelle unter der Wirkung des Lichts zustande kommen könne. Direkte Beobachtungen an Bakterien unter dem Mikroskop wurden wohl wegen der Kleinheit des Objekts bis jetzt nicht gemacht (dagegen fand Ehrismann (6) auf anderem Weg, nämlich mittels Trübungsmessungen, Aufhellung von Bakteriensuspensionen nach Bestrahlung; er betrachtete die Wirkung der ultravioletten Strahlen auf Bakterien im wesentlichen als einen kolloid-chemischen Vorgang, der zur Auflösung der Zelle führte). An größeren einzelligen Organismen wurden solche Untersuchungen über den Einfluß des Wirkungsmechanismus des Lichts gemacht. Gellhorn (7) und Höber (8) schrieben der Lichtwirkung eine Beeinflussung der Durchlässigkeit tierischer und pflanzlicher Zellen zu und führten als Beweis die Versuche von Packard und Tschahotine, sowie von Lepeschkin, Tröndle und Ruhland an. Packard zeigte an mit Neutralrot gefärbten Paramaecien, daß das Protoplasma durch Ammoniak umso rascher entfärbt wurde, je länger die Zellen dem Licht ausgesetzt waren; am stärksten war die Ammoniakdurchlässigkeit bei Bestrahlung mit dem durch Filter erhaltenen ultravioletten Teil des Spektrums. Die durch ultraviolette

Strahlen erzielte Permeabilitätssteigerung demonstrierte Tschahotine durch Belichten einer umschriebenen Stelle eines Seeigeleies mit einem ganz feinen ultravioletten Strahlenbündel. Die dadurch gesetzte Verletzung der Eioberfläche äußerte sich darin, daß für diese Stelle eine gesteigerte Durchlässigkeit für Wasser und für gelöste Stoffe nachgewiesen werden konnte; erstere dadurch, daß bei Uebertragung des Eies in eine hyper- bzw. hypotonische Salzlösung eine umschriebene Ein- bzw. Ausdellung des bestrahlten Bezirks beobachtet wurde, letztere auf analoge Weise, wie bei Paramaecien, wobei der Farbumschlag an der betroffenen Stelle auftrat. Die anderen oben erwähnten Autoren sahen bei pflanzlichen Zellen unter Einwirkung des Lichts erhöhte Permeabilität, vor allem für Elektrolyte, nicht für Zucker.

Wenn es sich aber bei der Wirkung des ultravioletten Lichts auf die Zellen tatsächlich um eine Aenderung der Permeabilität im Sinne einer Erhöhung handeln sollte, dann müßte hier die Vitalfärbbarkeit eine gewisse Aufklärung bringen, denn sie ist ja nach Eisenberg (9) eine Methode, die vor allem über die Permeabilität wertvolle Aufschlüsse liefern kann.

Solche Versuche wurden orientierenderweise von Saleck gemacht. Da Bacillen für die Beobachtung von Einzelheiten zu klein waren, wurden Hefezellen, die gewissermaßen nächst größeren pflanzlichen Gebilde, als Versuchsobjekte ausgewählt. Nach etwa 10 Minuten langer Bestrahlung mit der Quarzquecksilberlampe zeigten die Hefezellen bei Vitalfärbung mit verdünntem Methylenblau in ihrer überwiegenden Mehrzahl tiefblaue Färbung. Unbestrahlte Hefezellen dagegen färbten sich trotz stundenlanger Einwirkung der gleichen Farbstofflösung nicht bzw. in ganz geringer Zahl. Aus diesem Versuch mußte geschlossen werden, daß es doch wohl in erster Linie Veränderungen der Permeabilität, mit großer Wahrscheinlichkeit bedingt durch eine Schädigung des Ektoplasmas der Hefezellen, waren, die durch die Ultraviolettwirkung zustandekamen. Es fiel bei diesen Versuchen auf, daß einmal je nach der Dauer der Bestrahlung offensichtlich verschieden viele Zellen tiefblau gefärbt wurden — was ja zu erwarten war, da auch in den Versuchen mit Bakterien die Zahl der abgetöteten mit der Bestrahlungsdauer zusammenhing —, daß zum andern aber auch mit der Zunahme der Beobachtungsdauer des gefärbten Präparats sich in verhältnismäßig kurzer Zeit immer mehr Hefezellen blau färbten.

Es wurde mir die Aufgabe gestellt, diese Verhältnisse mit einer von Saleck ausgearbeiteten Methode quantitativ zu klären. Denn wenn sich hierbei konstante, von der Bestrahlung abhängige Werte ergeben würden, so könnte die Vitalfärbbarkeit der Hefezellen als eine biologische Methode zur Bestimmung der Wertigkeit einer Lichtquelle hinsichtlich ihres Gehalts an ultravioletten Strahlen benützt werden, gerade so wie seither die Abtötung der Bakterien dazu verwendet wurde.

Für die Bestrahlung der Hefezellen kam nur die Versuchsanordnung nach Thiele und Wolf in Betracht, da nur bei ihr alle Nebeneinflüsse, die ebenfalls auf die Keime schädigend wirken könnten, ausgeschaltet wurden.

Versuchsanordnung.

Von einer 48stündigen Reinkultur von Saccharomyces cerevisiae wurde eine Oese in 5 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Von dieser Aufschwemmung wurden 3 Tropfen in 7 ccm sterile physiologische Kochsalzlösung gegeben und diese ganz klare Suspension in einem Quarzreagensglas, das in ein als Wasserbad hergerichtetes Akkumulatorengefäß mit Quarzfenster gebracht wurde, bei der konstanten Temperatur von 18° C unter dauerndem langsamem Drehen, um Beschattung der Hefezellen untereinander zu verhindern, verschieden lange Zeit bestrahlt. Die bestrahlte Hefesuspension wurde 5 Minuten lang zentrifugiert, darauf die Kochsalzlösung abgegossen und der zurückgebliebene Bodensatz in 0,1 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm Methylenblaulösung 1 : 10 000 wieder aufgeschwemmt. Alsdann wurde mit dieser Aufschwemmung sogleich die Türk'sche (Blutkörperchen-) Zählkammer beschickt und die blau gefärbten Hefezellen sofort, ferner 15, 30, 45, 60 und 75 Minuten nach dem Zusetzen des Farbstoffs unter dem Mikroskop, am besten mit Hilfe eines Kreuztischs, gezählt und die gefundenen Werte dann auch in Prozenten der Gesamtzellenzahlen angegeben.

Die Bestrahlungen wurden mit den bei allen anderen derartigen Versuchen gewöhnlich benutzten Ultraviolettquellen: mit der Hanauer Quarzquecksilberlampe (Heraeus) ohne Reflektor und mit der Kohlenbogenlampe (Mikrokohlenbogenlampe von Leitz) durchgeführt.

Die Abstände betrugen bei der Quarzquecksilberlampe 10 und 20 cm, bei der Kohlenbogenlampe 20 cm, je vom Quarzfenster

des Akkumulatorengefäßes an gemessen; dazu kamen jedesmal noch 4 cm bis zur Mitte des Quarzreagensglases. So ist der Anschluß an die Untersuchungen von Thiele und Wolf und von Oehlschlägel möglich.

Die Bestrahlungsdauer wurde jedesmal von dem Moment des Entzündens an gerechnet. Dies muß besonders hinsichtlich der Quarzquecksilberlampe betont werden, da deren Ultravioletintensität während der Zeit des Einbrennens nicht konstant ist, sondern mit zunehmender Brenndauer allmählich zur vollen Höhe ansteigt.

Es war selbstverständlich, daß auf größte Sauberkeit der bei der Bestrahlung verwendeten Gefäße und auf größte Klarheit des destillierten Wassers gesehen wurde, da ja die geringste Trübung schon bedeutende Verluste an Ultravioletstrahlen verursacht hätte. Auch die Hefeaufschwemmung wurde so stark verdünnt, daß sie weder gegen das Fenster noch gegen einen dunklen Hintergrund gehalten, im geringsten getrübt erschien. Dies wurde durch die oben angegebene Verdünnungsweise erreicht. Denn schon die Arbeit von Thiele und Wolf zeigte, daß in getrübte Bakterienaufschwemmungen ultraviolette Strahlen nur sehr wenig tief eindrangen, wodurch dann keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden konnten.

Die Erwärmung des Wasserbads, die besonders bei der Kohlenbogenlampe die Konstanz der Temperatur von 18° C bedrohte, wurde mit Hilfe einer eingebrachten Kühlschlange, durch die kaltes Leitungswasser bei Bedarf geschickt wurde, kompensiert, wobei durch leichtes Umrühren im ganzen Gefäß die gleiche Temperatur aufrechterhalten wurde.

Die Herstellung der zur Vitalfärbung benützten Methylenblaulösung geschah nach der Vorschrift von Will (10):

„1 g Farbstoff wird in 100 ccm destilliertem Wasser gelöst und von dieser Lösung 1 ccm mit 100 ccm Wasser verdünnt."

Die im Versuch zur Wirkung gekommene Verdünnung war, da die Methylenblaulösung 1 : 10 000 zu gleichen Teilen mit steriler physiologischer Kochsalzlösung versetzt wurde, 1 : 20 000. Von einer Giftwirkung auf die Hefezellen konnte, wie auch aus der Tabelle 4 hervorgeht, wohl kaum mehr gesprochen werden.

Die Auswahl der gefärbten Zellen unter dem Mikroskop mußte sehr exakt getroffen werden. Dies gelang aber nach kurzer Uebung ohne Schwierigkeiten, was schon daraus hervorging, daß die von Saleck und mir selbst abwechselnd gezählten

Versuchsreihen gut übereinstimmten. Irgendeine Beeinflussung des Untersuchers beim Auszählen der Zellen eines Versuchs wurde dadurch unmöglich gemacht, daß die Gesamtzahl der Hefezellen erst bei der letzten Zählung festgestellt wurde und darnach erst die Prozentzahlen berechnet werden konnten. Selbstverständlich war es unmöglich und unnötig, mit der Platinöse immer die gleiche Zahl von Hefezellen in die Türk'sche Zählkammer zu bringen. Wie verschieden groß aber die absoluten Zahlen waren, ist aus den Tabellen zu ersehen.

Jeder einzelne Versuch wurde mindestens dreimal an verschiedenen Tagen mit immer wieder anderen Hefezellensuspensionen wiederholt. Dann wurde aus diesen Einzelversuchen der Mittelwert errechnet. Die Ergebnisse der Einzelversuche und die Mittelwerte wurden in den nachstehenden Tabellen verzeichnet, die Mittelwerte außerdem in Kurvenform graphisch dargestellt. (Kurven I—VI).

Zur Kontrolle, d. h. um das Verhalten der nicht bestrahlten Hefezellen gegenüber einer Methylenblaulösung 1 : 10 000 (bzw. 1 : 20 000) im Verlauf von 75 Minuten zeigen zu können, wurde dieselbe Hefezellensuspension unbestrahlt genau so behandelt, wie die bestrahlte. Das Ergebnis dieser Versuche wurde in Tabelle 4 (Kurve IV) niedergelegt.

Ergebnisse.

Tabelle 1:

Quarzquecksilberlampe: Abstand 10 (+4) cm.

Bestrahlungszeit	Zahl der gefärbten Hefezellen nach: 0' Zahl = %	15' Zahl = %	30' Zahl = %	45' Zahl = %	60' Zahl = %	75' Zahl = %	Gesamtzahl der Hefezellen
1'	11= 3,98	17= 5,65	24= 7,97	40=13,27	55=18,27	66=19,96	301
	16= 3,88	22= 5,34	29= 7,04	42=10,19	50=12,13	57=13,83	412
	16= 4,78	16= 8,08	37=11,08	46=13,77	56=16,77	68=20,36	334
	M.W. * 4,21	6,36	8,69	12,41	15,72	18,05	
2'	14= 3,23	93=21,48	129=29,79	155=35,79	169=39,40	179=41,34	433
	10= 2,73	67=18,25	89=24,24	113=30,78	124=33,78	133=36,23	367
	29= 2,75	200=18,97	280=26,56	339=32,16	378=35,86	402=38,14	1054
	M.W. 2,90	19,56	26,86	32,91	36,51	38,57	
3'	16= 3,93	157=38,53	233=57,25	269=66,09	309=76,14	327=80,34	407
	22= 5,05	159=36,47	241=55,27	257=58,94	436=66,96	306=70,10	436
	30= 4,44	241=35,76	341=50,59	407=60,38	494=73,29	549=84,85	647
	M.W. 4,47	36,92	54,37	61,80	72,13	78,76	
4'	67=11,63	236=40,97	364=63,19	504=87,50	545=94,62	556=96,53	576
	91=10,44	339=38,88	690=79,21	813=93,23	854=97,94	858=98,39	872
	131=10,25	569=44,52	1021=79,89	1215=95,07	1264=98,91	1275=99,77	1278
	M.W. 10,77	41,46	74,09	91,93	97,16	98,23	
5'	148=52,48	267=94,67	279=98,94	279=98,94			282
	390=51,31	730=96,05	756=99,47	758=99,74			760
	159=53,00	287=95,67	296=98,67	298=99,24			300
	M.W. 52,26	95,46	99,08	99,14			
6'	478=81,85	575=98,29	581=99,32	583=99,68			585
	639=80,48	779=98,12	787=99,12	789=99,27			794
	378=79,75	466=98,32	469=98,95	471=99,27			474
	M.W. 80,69	98,24	99,13	99,41			
7'	156=96,88	161=99,38	162=100,0				162
	286=96,29	295=99,33	296=99,67				297
	533=97,27	547=100,0	546=100,0				547
	M.W. 96,81	99,56	99,89				

*) M.W. = Mittelwert.

Tabelle 2:

Quarzquecksilberlampe: Abstand 20 (+ 4) cm.

Bestrahlungszeit	Zahl der gefärbten Hefezellen nach: 0' Zahl = %	15' Zahl = %	30' Zahl = %	45' Zahl = %	60' Zahl = %	75' Zahl = %	Gesamtzahl d. Hefezellen
4'	27 = 3,72	41 = 5,65	80 = 11,02	114 = 15,70	128 = 17,63	147 = 20,25	726
	20 = 4,62	27 = 6,23	41 = 9,46	54 = 12,46	58 = 13,39	75 = 17,32	433
	28 = 3,53	42 = 5,29	81 = 10,20	121 = 15,24	136 = 17,13	158 = 19,89	794
	M.W. 3,96	5,72	10,23	14,47	16,05	19,15	
5'	45 = 4,33	69 = 6,64	111 = 10,69	161 = 15,51	199 = 19,17	249 = 23,99	1038
	30 = 5,70	44 = 8,36	70 = 13,31	85 = 16,16	100 = 19,01	126 = 23,95	526
	29 = 4,34	44 = 6,58	70 = 10,48	94 = 14,08	124 = 18,56	143 = 21,56	668
	M.W. 4,79	7,19	11,49	15,25	18,91	23,17	
6'	27 = 8,31	59 = 18,15	106 = 32,61	124 = 38,15	146 = 43,08	149 = 45,84	325
	34 = 8,83	61 = 15,84	93 = 24,15	103 = 26,75	145 = 37,66	165 = 42,84	385
	47 = 9,32	93 = 18,49	147 = 29,16	194 = 38,49	223 = 44,24	233 = 46,22	504
	73 = 7,36	92 = 9,27	189 = 19,05	264 = 26,66	364 = 36,68	409 = 41,23	992
	24 = 5,41	31 = 6,99	52 = 11,69	73 = 16,47	113 = 25,47	135 = 30,47	443
	M.W. 7,84	13,75	23,33	29,30	37,03	41,32	
7'	52 = 6,46	147 = 18,26	213 = 26,46	280 = 34,68	331 = 41,12	408 = 50,68	805
	72 = 10,36	145 = 19,42	225 = 32,37	293 = 42,16	328 = 47,19	393 = 56,74	695
	25 = 9,36	52 = 19,44	77 = 28,84	112 = 41,94	132 = 49,81	147 = 55,06	267
	37 = 9,34	81 = 20,45	130 = 32,83	156 = 39,39	193 = 48,73	217 = 54,78	396
	M.W. 8,85	19,39	30,13	39,57	46,71	54,32	
8'	120 = 24,84	196 = 40,57	263 = 54,45	317 = 65,63	328 = 67,91	352 = 73,33	483
	162 = 26,26	273 = 44,24	339 = 54,94	441 = 71,47	461 = 74,72	482 = 78,12	617
	200 = 23,69	380 = 45,02	477 = 56,52	539 = 63,89	558 = 66,12	590 = 70,76	824
	M.W. 24,93	43,28	55,30	66,99	69,58	74,07	
9'	505 = 33,67	1311 = 87,40	1448 = 96,53	1482 = 98,80	1490 = 99,34	1493 = 99,60	1500
	264 = 39,34	610 = 90,91	637 = 94,95	660 = 98,27	666 = 99,26		671
	399 = 34,11	1069 = 91,45	1148 = 98,23	1159 = 99,14	1165 = 99,66		1169
	M.W. 35,71	89,92	96,57	98,74	99,42		
10'	585 = 90,42	643 = 99,38	643 = 99,38				647
	365 = 91,25	398 = 99,50	400 = 100,0				400
	430 = 89,79	467 = 99,36	468 = 99,57				470
	M.W. 90,48	99,41	99,65				

Tabelle 3:
Kohlenbogenlampe: Abstand 20 (+4) cm.

Bestrahlungszeit	Zahl der gefärbten Hefezellen nach: 0' Zahl = %	15' Zahl = %	30' Zahl = %	45' Zahl = %	60' Zahl = %	75' Zahl = %	Gesamtzahl d. Hefezellen
15'	18= 2,40	28= 3,73	36= 4,80	38= 5,07	42= 5,60	43= 5,73	750
	8= 2,47	16= 4,94	23= 7,09	24= 7,41	25= 7,72	25= 7,72	324
	8= 1,77	10= 2,21	15= 3,31	18= 3,97	20= 4,41	22= 4,85	453
	M.W. 2,21	3,63	5,07	5,48	5,98	6,10	
30'	52= 5,73	110=12,13	233=25,67	343=37,75	424=46,75	479=52,81	907
	46= 5,21	78= 8,84	169=19,16	214=24,25	264=29,93	288=32,66	882
	43= 5,35	88=10,96	196=24,41	294=36,75	337=41,97	395=49,19	803
	22= 3,05	70= 9,71	122=16,92	200=27,74	245=33,98	278=38,56	721
	M.W. 4,85	10,41	21,54	31,82	38,16	43,31	
60'	49= 5,21	145=15,57	407=43,72	652=70,03	836=89,80	879=95,49	931
	29= 5,71	86=18,89	248=48,82	346=66,09	468=92,13	496=97,64	508
	52= 5,69	123=13,58	446=48,85	666=72,95	863=94,53	900=98,58	913
	M.W. 5,54	16,01	47,13	69,69	92,15	97,24	
90'	34= 6,60	160=31,13	282=54,76	410=79,61	507=98,45	512=99,42	515
	68= 8,33	249=30,51	470=57,59	672=82,36	803=98,41	812=99,52	816
	85= 8,18	268=25,67	481=46,29	761=73,24	980=94,32	1034=99,52	1039
	M.W. 7,70	29,44	52,88	78,40	97,06	99,49	
120'	852=68,43	1028=82,57	1172=94,13	1233=99,04	1242=99,76		1245
	795=64,37	1053=85,26	1171=94,82	1215=98,38	1219=98,78		1235
	900=69,28	1163=89,53	1283=98,77	1297=99,85	1299=100,0		1291
	M.W. 67,33	85,79	95,91	99,09	99,51		

Tabelle 4:
Unbestrahlte Hefezellen.

Bestrahlungszeit	Zahl der gefärbten Hefezellen nach: 0' Zahl = %	15' Zahl = %	30' Zahl = %	45' Zahl = %	60' Zahl = %	75' Zahl = %	Gesamtzahl d. Hefezellen
	6= 0,82	17= 2,33	18= 2,47	23= 3,16	26= 3,56	42= 5,77	728
	6= 1,25	11= 2,29	13= 2,71	16= 3,34	16= 3,34	18= 3,75	479
	6= 1,41	7= 1,64	7= 1,64	10= 2,35	10= 2,35	12= 2,80	426
	M.W. 1,16	2,09	2,27	2,95	3,18	4,11	

Tabelle 5:

Quarzquecksilberlampe: Abstand 10 (+4) cm. Steinsalzfilter.

Bestrahlungszeit	Zahl der gefärbten Hefezellen nach: 0' Zahl = %	15' Zahl = %	30' Zahl = %	45' Zahl = %	60' Zahl = %	75' Zahl = %	Gesamtzahl d. Hefezellen
7'	50=57,47	76=87,35	84=96,55	84=96,55			87
	99=56,25	131=74,43	141=80,11	156=88,63			176
	441=67,12	557=84,77	634=96,50	643=97,88			657
	345=85,82	385=95,77	402=100,0	402=100,0			402
	192=80,67	225=94,53	231=97,07	234=98,62			238
	580=76,67	706=96,98	715=98,22	724=99,45			728
	M.W. 70,67	88,97	94,57	96,85			

Tabelle 6:

Quarzquecksilberlampe: Abstand 10 (+ 4) cm. Spiegelglasfilter.

Bestrahlungszeit	Zahl der gefärbten Hefezellen nach: 0' Zahl = %	15' Zahl = %	30' Zahl = %	45' Zahl = %	60' Zahl = %	75' Zahl = %	Gesamtzahl der Hefezellen
	8= 2,39	9= 2,69	11= 3,28	13= 3,88	13= 3,88	14= 4,18	335
	4= 2,13	4= 2,13	7= 3,28	9= 4,92	10= 5,46	10= 5,46	183
	7= 1,58	11= 2,48	13= 2,93	15= 3,46	16= 3,61	19= 4,31	444
	M.W. 2,03	2,43	3,16	4,09	4,32	4,65	

Sämtliche Bestrahlungsversuche zeigen übereinstimmend:

1. daß mit zunehmender Bestrahlungsdauer die Zahl der mit Methylenblau vital färbbaren Hefezellen sofort nach der Färbung zunimmt,

2. daß mit zunehmender Färbedauer die Zahl der mit Methylenblau gefärbten Hefezellen immer mehr ansteigt,

3. daß dieses Ansteigen der Zahl der gefärbten Hefezellen mit zunehmender Färbedauer bei zunehmender Bestrahlungsdauer immer rascher erfolgt,

4. daß aber das Tempo dieses Ansteigens der Zahl der gefärbten Hefezellen mit zunehmender Färbedauer bei zunehmender Bestrahlungsdauer, gleichen Abstand der Lichtquellen vorausgesetzt, abhängig ist von der Art der Lichtquelle.

Die nicht bestrahlten Hefezellen dagegen verhalten sich gegenüber der Vitalfärbung sehr resistent, nur vereinzelte der Zellen sind gefärbt und die Zahl der gefärbten Zellen nimmt auch nach 75 Minuten langer Einwirkung des Farbstoffs nicht wesentlich zu. (Vgl. Tabelle 4 und Kurve IV).

Die grundlegende Frage, ob die für jede Bestrahlungsdauer ausgeführten Einzelversuche immer gleich ausfallen, ist nach Durchsicht aller Tabellen unbedingt zu bejahen. Man ist sogar fast überrascht über die Regelmäßigkeit, wenn man bedenkt, daß es sich hier nicht um eine physikalische oder chemische, sondern um eine mit einem lebenden Organismus vorgenommene Bestimmung handelt.

Die relativ größten Unterschiede finden sich bei den niederen Bestrahlungszeiten. Hier dürfte das Einbrennen der Lampen ein Rolle spielen, das eben z. B. in einer Minute bei der Quarzquecksilberlampe unter Umständen einmal nicht so gut ist. Auch momentane Netzschwankungen können hier das Ergebnis beeinflussen.

Bei den höheren Bestrahlungszeiten ist jedoch die Uebereinstimmung bei den einzelnen Versuchen ausgezeichnet.
Auch die Abnahme der Strahlenwirkung bei zunehmender Entfernung geht aus dem Vergleich der Leistungen der Quarzquecksilberlampe bei 10 und bei 20 cm Abstand deutlich hervor. (Vgl. Tabelle 1 und 2 und Kurve I und II).

Weiter ergibt sich, daß diese Untersuchung der Vitalfärbbarkeit der Hefezellen nicht nur, wie die Kulturversuche mit bestrahlten Bakterien, das Endergebnis des Versuchs, also die Frage: abgetötet oder lebendig, darbietet, sondern gewissermaßen eine Absterbeordnung zeigt, die sich gesetzmäßig vollzieht. Diese Absterbeordnung demonstriert noch viel anschaulicher die verschiedene Ultraviolettintensität und damit die verschiedenartige Wirkungsweise der beiden untersuchten Lichtquellen. So würde man nach dem Endergebnis der Vitalfärbungsbeobachtung nach 75 Minuten sagen: Die Quarzquecksilberlampe führt eine maximale Schädigung der Hefezellen herbei in 10 cm Abstand nach 4 Minuten, in 20 cm Abstand nach 9 Minuten und die Kohlenbogenlampe in 20 cm Abstand nach 60 Minuten. Sieht man sich aber den Betrahlungseffekt sofort nach der Bestrahlung an, so sind die entsprechenden Zeiten 7 Minuten, 10 Minuten (oder noch mehr) und weit über 120 Minuten.

Das Ansteigen der Zahl der vital gefärbten Hefezellen während der Färbedauer demonstriert sehr deutlich den Unterschied in der Ultraviolettintensität bei den beiden untersuchten Lichtquellen. Man sieht daraus die intensive Ultravioletwirkung der objektnahen Quarzquecksilberlampe, ihre etwas abgemilderte, aber doch noch sehr starke Strahlung bei größerer Entfernung. So bekommt man z. B. etwa dieselbe Wirkung auf die Hefezellen bei 1 Minute Bestrahlungsdauer in 10 cm und bei 4 Minuten in 20 cm Entfernung. Im Vergleich dazu steht die geradezu milde Kohlenbogenlampe, die bei der gleichen Entfernung wie die Quarzquecksilberlampe (20 cm) trotz hoher Bestrahlungszeiten einen langsamen und nur ganz allmählichen Anstieg der Schädigung erkennen läßt. (Vgl. Kurve II u. III).

Stillschweigend wird bisher in Analogie zu den Abtötungswirkungen auf Bakterien vorausgesetzt, daß es die ultravioletten Strahlen sind, die diese erhöhte Bereitschaft der Hefezellen für die Vitalfärbung bewirken. Diese Annahme muß aber noch experimentell bewiesen werden.

Dazu wird derselbe Weg beschritten, den schon T h i e l e und W o l f (4) gegangen sind. Blaues Steinsalz blendet alle sichtbaren Strahlen ab, läßt die ultravioletten dagegen durch, so daß man Bakterien mit ultravioletten Strahlen in absolut dunklem Raum abzutöten vermag. Umgekehrt läßt eine Spiegelglasscheibe alle sichtbaren Strahlen durchgehen und hält alle ultravioletten zurück.

Das Institut ist in der glücklichen Lage, ein Stück blauen Steinsalzes zu besitzen; allerdings hat es auch einige weiße Stellen, das sichtbare Licht wird aber so weitgehend abgeblendet, daß sich sofort Unterschiede im Bestrahlungseffekt zeigen müßten, wenn andere, als die Ultraviolettstrahlen, maßgebenden Anteil an der Strahlenwirkung hätten.

Das Stück blauen Steinsalzes wurde lichtdicht in die Seitenwand einer kleinen, passenden Kiste eingelassen und auch die vorn beschriebene Versuchsanordnung in der Kiste lichtdicht untergebracht. So konnte das Licht der 10 cm vor der Quarzscheibe des Akkumulatorengefäßes aufgestellten Quarzquecksilberlampe nur durch das blaue Steinsalz hindurch auf das Quarzfenster und von hier an das im Wasserbad befindliche Quarzrohr mit den Hefezellen gelangen. Bestrahlt wurde mit der im entsprechenden normalen Versuch maximalen Bestrahlungsdauer von 7 Minuten. Das Ergebnis dieser öfters wieder-

holten Bestrahlungen ist in Tabelle 5 bezw. Kurve V dargestellt.

Da hierbei besonders in den Anfangswerten bei der Vitalfärbung schwankende Ergebnisse erhalten wurden, wurde das Augenmerk auf die genaue Lokalisation des Röhrchens zu den vorwiegend blauen bezw. vorwiegend weißen Bezirken gerichtet. Dadurch konnte mühelos der Unterschied der Ergebnisse aufgeklärt werden: in den vorwiegend blauen Bezirken war die Wirkung, gemessen an den Anfangswerten, bei der Vitalfärbung etwas schwächer, als in den vorwiegend weißen Bezirken. Dies dürfte mit allergrößter Wahrscheinlichkeit in der verschiedenen Struktur des Steinsalzstücks begründet sein, das in den blauen Bezirken wohl auch etwas weniger Ultraviolettstrahlung durchließ, bedingt durch Verluste infolge von Reflexion, Kristallstruktur, feinsten Trübungen zwischen den Kristallaufbauten.

Der Endeffekt ist aber in beiden Bezirken derselbe, nämlich die Blaufärbung aller Hefezellen. Verglichen mit der bei 7 Minuten Bestrahlungsdauer erzielten Wirkung ohne blaues Steinsalzfilter ist nur eine leichte Abschwächung derselben am Anfang der Beobachtungszeit mit Steinsalz festzustellen, die eben auch durch die bereits erwähnten Momente zu erklären ist. (Vgl. Tabelle 1 und 5 bezw. Kurve I u. V).

Bei Vorschaltung einer Spiegelglasscheibe von 7,5 mm Durchmesser vor die gleiche Versuchsanordnung hört dagegen jede Wirkung der Bestrahlung durch die Quarzquecksilberlampe auf. Die so bestrahlten Hefezellen verhalten sich genau wie unbestrahlte. (Vgl. Tabelle 4 u. 6 und Kurve IV und VI).

Diese Versuche mit dem blauen Steinsalz und der Spiegelglasscheibe beweisen eindeutig, daß es in der Tat die ultravioletten Strahlen sind, welche diese erhöhte Bereitschaft der Hefezellen zur Aufnahme von Farbstoff hervorrufen.

Die weitere Frage, die sich unwillkürlich aufdrängt, die jedoch nur diskutiert, nicht experimentell entschieden werden soll, da das dieser Arbeit gesteckte Ziel überschritten würde, ist, ob es sich bei den tiefblau gefärbten Zellen um unter der Ultraviolettstrahlenwirkung abgetötete Hefenzellen handelt. Nach Henneberg (11) und nach Will (10) dient bei den Hefeuntersuchungen im Gärungsbetrieb die wässrige Methylenblaulösung 1 : 10 000 zum Nachweis der toten Hefezellen. Als tot sind nach Will (l. c.) solche Hefezellen anzusprechen, welche

nach unmittelbarer Berührung mit der Lösung den Farbstoff aufspeichern, sich also sehr stark färben. Bei länger andauernder Einwirkung selbst verdünnter Lösungen machen sich Giftwirkungen auf die Organismen geltend. Einzelne lebende Zellen färben sich nur äußerlich, die Färbung ist in der Regel bedeutend schwächer als bei den toten Zellen. Auch nach Henneberg (l. c.) kann man die toten Hefezellen an der sehr schnell eintretenden Färbung erkennen.

Auch Eisenberg (l. c.) glaubt bei der Besprechung der Vitalfärbung der Sproßpilze nicht fehlzugehen in der Annahme, daß stärkere Färbungsgrade nur an laedierten Zellen erfolgen. Allerdings scheinen nach Bokorny (citiert nach Eisenberg) sogar ziemlich intensiv gefärbte Hefenzellen noch sprossen zu können.

Da bei unsern Versuchen nur die prall, also ganz intensiv blau gefärbten Hefezellen gerechnet werden, so dürfte es sich dabei aller Wahrscheinlichkeit nach um abgetötete Zellen handeln.

Die hier beobachtete Zunahme der Vitalfärbbarkeit nach einer sicher erfolgten Zellschädigung scheint doch die Annahme Eisenbergs (l. c.) zu stützen, daß das Prädikat „vital" cum grano salis aufzufassen und daß an seiner Stelle sicher in vielen Fällen „postvital" zu setzen ist. Weitere Untersuchungen mit Züchtung bestrahlter Hefezellen unter paralleler Vitalfärbung müssen hier völlige Klarheit schaffen.

Da die erhöhte Vitalfärbbarkeit der Hefezellen nach ihrer Bestrahlung mit ultraviolettem Licht gemäß den Ergebnissen der hier geschilderten Versuche mit großer Konstanz auftritt, mit der beschriebenen Versuchsanordnung zahlenmäßig exakt ausgedrückt werden kann und sich abhängig von der Art der Lichtquelle und ihrer Entfernung vom bestrahlten Objekt zeigt, so scheint die hier geprüfte Methode geeignet, auch zur biologischen Prüfung der verschiedenen Ultraviolettlichtquellen herangezogen zu werden. Dabei ist die Einfachheit der Untersuchungstechnik hervorzuheben.

Zusammenfassung.

1. Die Vitalfärbbarkeit der Hefezellen wird durch die Einwirkung der ultravioletten Strahlen erhöht.

2. Mittels einer von S a l e c k angegebenen Methode wird diese Erscheinung quantitativ untersucht. Es zeigt sich, daß die Menge der vital gefärbten Hefezellen abhängig ist von der Art der Lichtquelle, sowie ihrer Entfernung von den bestrahlten Hefezellen.

3. Die mit dieser Methode erhaltenen Werte sind unter denselben Bedingungen sehr konstant.

4. Deshalb ist die Methode geeignet, zur biologischen Prüfung einer Lichtquelle auf ihren Gehalt an ultravioletten Strahlen verwendet zu werden.

Zum Schluß erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. W o l f für die freundliche Aufnahme in seinem Institut, und Herrn Privatdozent Dr. S a l e c k für die Anregung zu dieser Arbeit und die mir gewährte gütige Unterstützung ergebenst zu danken.

Literatur-Verzeichnis.

1) Reichel H.:
Desinfektions- und Sterilisationslehre. 1. Allgemeiner und physikalischer Teil, in: Kolle und Wassermann, Handbuch d. pathogenen Microorganismen, 3. Aufl. (1931), 3. 867.

2) Graßberger R.:
Die Desinfektion, in: Rubner, Gruber, Ficker, Handbuch d. Hygiene 3. 1. Abt. **(1913), 3.** 867.

3) Buchner H.:
Zbl. Bakter. **11.** (1892), 781
12. (1892), 217.

4) Thiele H. u. Wolf K.:
Arch. Hyg. **57.** (1906), 29.
u. **60.** (1907), 29.

5) Oehlschlägel L.:
Arch. Hyg. **91.** (1922), 177.

6) Ehrismann O.:
Z. Hyg. **111.** (1930), 618.

7) Gellhorn E.:
Das Permeabilitätsproblem. Monogr. a. d. Ges. Geb. der Physiologie d. Pflanzen u. Tiere **16.** Berlin **1929.**

8) Höber R.:
Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe Leipzig **1922—24.**

9) Eisenberg Ph.:
Ueber Vitalfärbung der Bakterien: in Kraus-Uhlenhuth, Handbuch d. mikrobiolog. Technik. **1** (1922), 257.

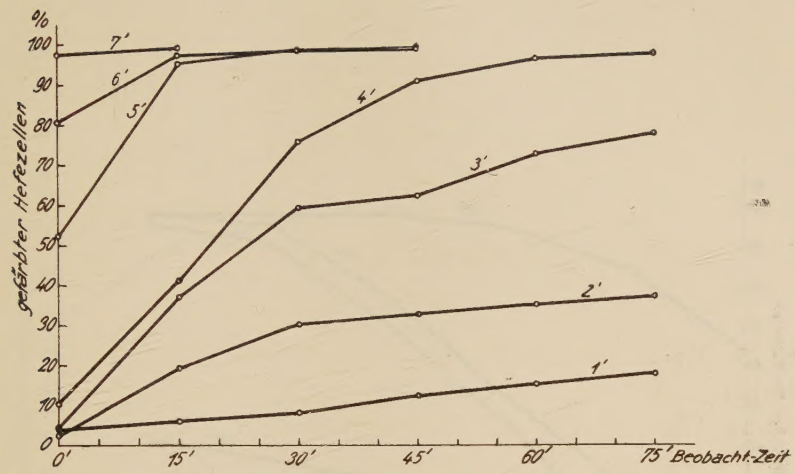
10) Will H.:
Anleitung zur biologischen Untersuchung und Begutachtung von Bierwürze, Bierhefe, Bier- und Brauwasser, zur Betriebskontrolle, sowie zur Hefereinzucht. Oldenbourgs techn. Handbibliothek **10,** München-Berlin **1909,** 158 u. 440.

11) Henneberg W.:
Gärungsbakteriolog. Praktikum, Betriebsuntersuchungen u. Betriebskunde, Berlin 63 **1909.**

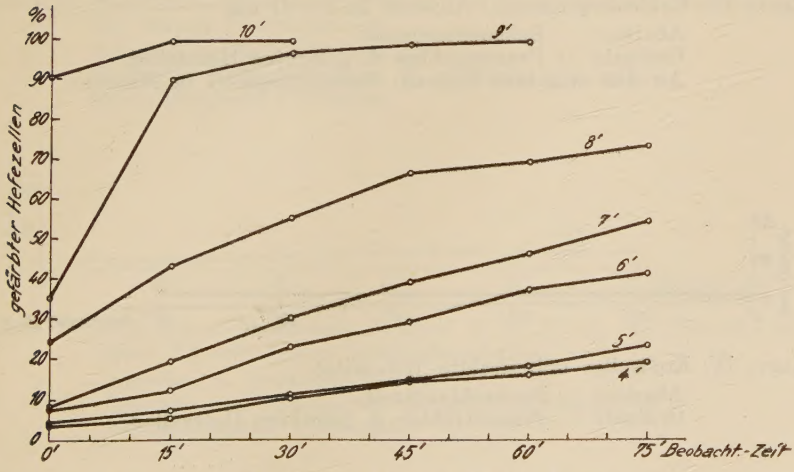
Lebenslauf.

Am 23. März 1906 wurde ich, Willy Rupp, zu Roth bei Nürnberg als Sohn des Dentisten Michael Rupp und seiner Ehefrau Therese geboren. Vom 1. Mai 1912 bis 15. Juli 1916 besuchte ich die Volkshauptschule Roth, anschließend daran vom 1. September 1916 bis 27. April 1921 die Progymnasien zu Schwabach und Rothenburg o. T. Vom 1. Mai 1921 — 30. April 1924 erlernte ich in der väterlichen Praxis die Zahntechnik. Als Techniker war ich anschließend noch bis 1. Nov. 1924 bei meinem Vater und dann in derselben Eigenschaft bei Herrn Dentist Bloching in Wunsiedel tätig (bis 31. I. 26).

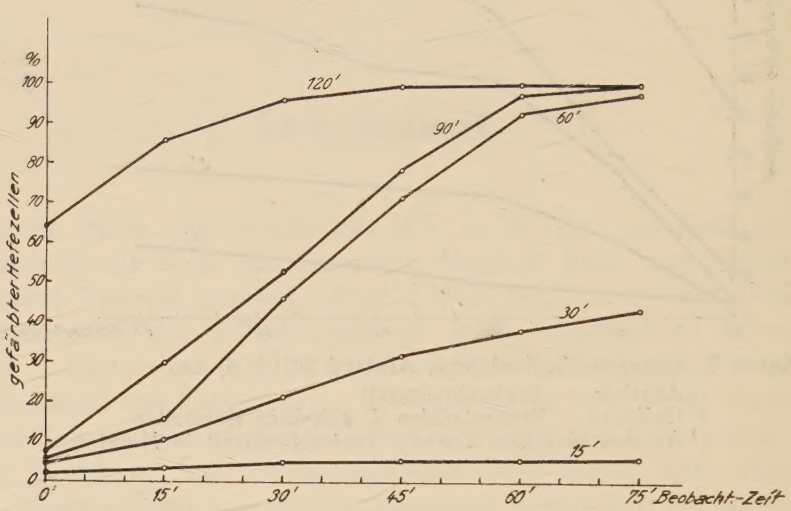
Vom 1. Februar 1926 an bereitete ich mich im Institut Stadler zu Coburg auf das Abitur vor, das ich im Frühjahr 1928 bestand. Vom S. S. 1928 an widmete ich mich dem Studium der Zahnheilkunde an den Universitäten München, Tübingen, (Physikum S. S. 29), Würzburg, Tübingen (Staatsexamen Herbst 1931).



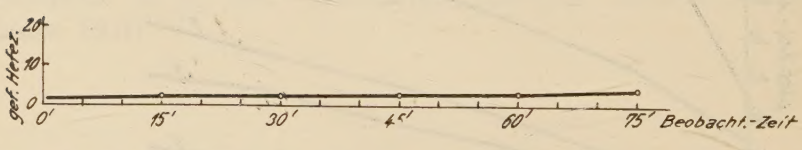
Kurve I.: Quarzquecksilberlampe, Abstand 10 (+ 4) cm.
Abszisse = Beobachtungszeit
Ordinate = Prozentzahlen d. gefärbten Hefezellen
An den einzelnen Kurven: Bestrahlungszeit in Minuten.



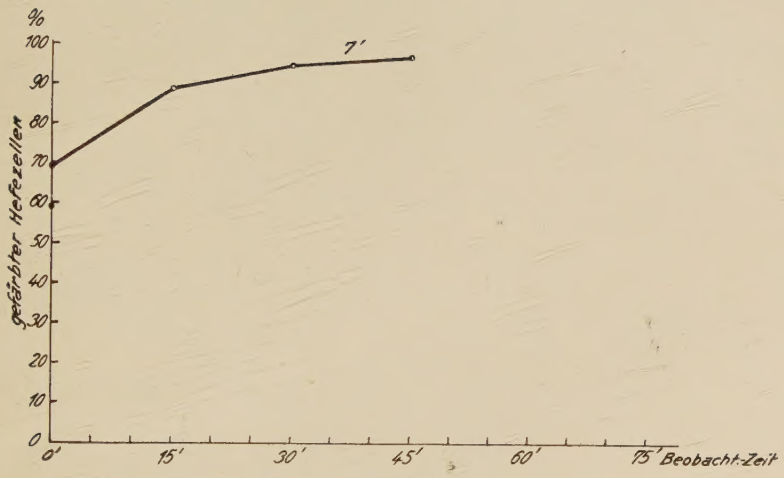
Kurve II: Quarzquecksilberlampe, Abstand 20 (+ 4) cm.
Abszisse = Beobachtungszeit
Ordinate = Prozentzahlen d. gefärbten Hefezellen
An den einzelnen Kurven: Bestrahlungszeit in Minuten.



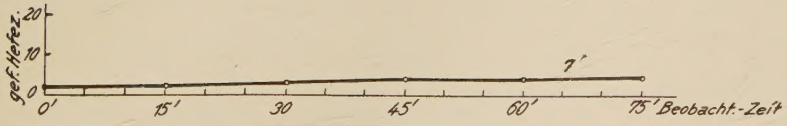
Kurve III: Kohlenbogenlampe, Abstand 20 (+ 4) cm.
Abszisse = Beobachtungszeit
Ordinate = Prozentzahlen d. gefärbten Hefezellen
An den einzelnen Kurven: Bestrahlungszeit in Minuten.



Kurve IV: Kontrolle: unbestrahlte Hefezellen.
Abszisse = Beobachtungszeit
Ordinate = Prozentzahlen d. gefärbten Hefezellen.



Kurve V: Quarzquecksilberlampe, Abstand 10 (+ 4) cm, mit Vorschaltung des blauen Steinsalzstücks.
Abszisse = Beobachtungszeit
Ordinate = Prozentzahlen d. gefärbten Hefezellen
Bestrahlungszeit 7 Minuten.



Kurve VI: Quarzquecksilberlampe, Abstand 10 (+ 4) cm, mit Vorschaltung einer 7,5 mm dicken Spiegelglasscheibe.
Abszisse = Beobachtungszeit
Ordinate = Prozentzahlen d. gefärbten Hefezellen
Bestrahlungszeit 7 Minuten.